



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DOTTORATO DI RICERCA IN SALUTE DELL'UOMO
CICLO XXIX

**CO-ESPRESSIONE DI VGLUT1 E VGAT
NEL CERVELLO DEL RATTO E DEL TOPO**

Tesi di dottorato di
Dott.ssa Chiara Ciriachi

Tutor
Prof. Fiorenzo Conti

Triennio 2013-2016

INDICE

Introduzione	1
<i>La sinapsi chimica e i neurotrasmettitori glutammato e GABA</i>	1
<i>Colocalizzazione di neurotrasmettitori</i>	2
<i>Scopo dello studio</i>	4
Materiali e metodi	5
<i>Animali</i>	5
<i>Preparazione del tessuto e identificazione delle regioni cerebrali</i>	5
<i>Immunofluorescenza</i>	7
<i>Microscopia confocale</i>	8
<i>Elaborazione delle immagini, raccolta e analisi dei dati</i>	9
Risultati	11
<i>Ratto</i>	11
<i>Topo</i>	13
Discussione	15
<i>Metodo</i>	15
<i>VGLUT1 e VGAT</i>	16
<i>Significato funzionale</i>	20
Bibliografia	23

Introduzione

La sinapsi chimica e i neurotrasmettitori glutammato e GABA

A partire dalla dimostrazione della trasmissione chimica dei segnali nervosi da parte di Otto Loewi e dalla scoperta dei primi “mediatori nervosi” da parte di Henry Halett Dale nei primi anni del XX secolo, molte molecole sono state annoverate tra i mediatori chimici della trasmissione sinaptica. Tra queste sono stati inclusi anche gli amminoacidi presenti nel sistema nervoso centrale (SNC) L-glutammato (glutammato) e acido γ -aminobutirrico (GABA) (Berl e Waelsch, 1958; Roberts e Kuriyama, 1968; Johnson, 1972; Roberts et al., 1981). Con lo sviluppo delle tecniche di immunistochemica e di anticorpi specifici per il glutammato e il GABA, è stato possibile dimostrare la loro presenza nelle vescicole sinaptiche, rispettivamente, di neuroni eccitatori e di interneuroni inibitori (Storm-Mathisen et al., 1983). L’immunoreattività del glutammato e del GABA è stata descritta nel cervello dei mammiferi fin dalle prime osservazioni nel bulbo olfattivo, nella corteccia cerebrale, nel talamo, nei gangli della base, nel tronco encefalico e nel cervelletto del ratto e del topo (Ottersen e Storm-Mathisen, 1984) e nella corteccia somatosensitiva del ratto, della scimmia e del gatto (Conti et al., 1987; 1989).

Oggi è noto che il glutammato e il GABA svolgono l’importante ruolo di neurotrasmettitori nella maggior parte delle sinapsi chimiche del SNC dei mammiferi e che sono i principali mediatori della conduzione veloce dei segnali, rispettivamente, eccitatori ed inibitori. La trasmissione eccitatoria è mediata da terminali che formano sinapsi asimmetriche che rilasciano glutammato e la trasmissione inibitoria è mediata da terminali sinaptici che formano sinapsi simmetriche che rilasciano GABA (Peters e Palay, 1996). Le risposte eccitatorie e inibitorie sono registrate come eventi di depolarizzazione (EPSP o EPSCs, Excitatory Post-Synaptic Potential o Currents) e di iperpolarizzazione (IPSP o IPSCs, Inhibitory Post-Synaptic Potential o Currents) del potenziale della membrana post-sinaptica e sono modulate dalla quantità del glutammato e del GABA rilasciati, dalla permanenza del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico e dall’efficacia della sua

azione su recettori post-sinaptici (Conti e Weinberg, 1999, Conti e Cherubini, 2001). Il sincronismo spazio-temporale di questi fenomeni conferisce al glutammato e al GABA un ruolo chiave nelle funzioni cognitive. Essi sostengono i fenomeni di sinaptogenesi e plasticità sinaptica (Durand et al., 1996; Hicks e Conti, 1996), la sincronizzazione dei circuiti cerebrali e l'economia energetica dei processi neurali (Buzsàki et al., 2004).

L'avanzamento delle conoscenze sulla neurotrasmissione aminoacidergica ha rivelato una grande complessità delle sue basi anatomiche. Sulla base delle conoscenze acquisite sulla cooperazione tra neuroni e cellule gliali, è stata ridisegnata l'unità fondamentale della trasmissione chimica a favore di una "sinapsi tripartita" che riconosce ai processi astrocitari peri-sinaptici un ruolo chiave nel sostenere e modulare la trasmissione neurochimica (Perea et al., 2009).

Colocalizzazione di neurotrasmettitori

Un aspetto interessante che emerge dalle ricerche degli ultimi 50 anni è costituito dalla scoperta che i diversi neurotrasmettitori colocalizzano in alcuni terminali sinaptici.

Per molto tempo le osservazioni sperimentali e le deduzioni sul funzionamento cerebrale sono state guidate dal "principio di Dale" secondo il quale i neuroni producono e rilasciano lo stesso neurotrasmettore in tutte le loro sinapsi (Eccles, 1986). Questo principio è stato rivisto nel corso del tempo a partire dalle prime evidenze della neuromodulazione esercitata da alcuni neuropeptidi co-espressi in alcuni terminali sinaptici insieme con neurotrasmettitori classici come l'acetilcolina (Whittaker et al., 1972; Silinsky, 1975), il GABA (Hökfelt e t al., 1984) e il glutammato (Weisskopf et al., 1993).

Alcune scoperte più recenti hanno dimostrato che due neurotrasmettitori possono co-esistere in uno stesso neurone ed essere rilasciati da uno stesso terminale sinaptico. E' stato dimostrato che in alcuni terminali sinaptici i due neurotrasmettitori inibitori GABA e glicina possono essere immagazzinati nelle stesse vescicole sinaptiche ed essere co-liberati (Jonas et al., 1998; Hnasko e Edwards, 2012; Aubrey, 2016) e che i neurotrasmettitori dopamina e serotonina sono co-espressi in

alcuni terminali dopaminergici nello striato (Zhou et al., 2005). E' stato osservato inoltre che alcuni neuroni glutamatergici liberano anche serotonina e dopamina (Lebrand et al., 1996; Sulzer et al., 1998) e che i motoneuroni del midollo spinale possono liberare sia glutammato sia acetilcolina (Nishimaru et al., 2005; Hnasko e Edwards, 2012).

Gli studi sui sistemi di trasmissione glutamatergica e GABAergica hanno rivestito (e rivestono ancora oggi) un ruolo chiave nella comprensione della funzionalità cerebrale. La maggior parte dei segnali trasmessi nel SNC è mediata dall'azione del glutammato e del GABA e il mantenimento dell'omeostasi tra l'azione eccitatoria e inibitoria dei sistemi di neurotrasmissione è alla base del fisiologico svolgimento delle funzioni cerebrali (Shu et al., 2003, Liu, 2004, Dehghani et al., 2016).

In alcune strutture cerebrali è stata osservata la co-espressione di glutammato e di GABA. Le prime osservazioni del GABA in alcuni neuroni corticali glutamatergici (10%) (Conti et al., 1987) sono state interpretate sulla base della possibile interconversione enzimatica tra glutammato e GABA che attesta la presenza di entrambi i neurotrasmettitori in alcune strutture del tessuto cerebrale (Hertz et al., 2006).

L'osservazione della co-espressione di glutammato e GABA in alcuni terminali sinaptici ha aperto nuovi scenari per gli studi della trasmissione aminoacidergica. Molti studi sull'ippocampo hanno dimostrato la presenza di GABA nei terminali sinaptici glutamatergici (Bramham et al., 1990) delle fibre provenienti dalle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo (mossy fibers, MFs) che fanno sinapsi sulle cellule piramidali della regione CA3 dell'ippocampo a livello dello strato lucido (Sandler e Smith, 1991; Sloviter et al., 1996). E' stato dimostrato che la stimolazione elettrica delle MFs provoca anche risposte inibitorie nei neuroni piramidali post-sinaptici (Walker et al., 2001). La presenza del glutammato e del GABA nelle vescicole sinaptiche di questi terminali è stata dimostrata al microscopio elettronico (Bergersen et al., 2003).

Grazie alla scoperta delle proteine che trasportano glutammato e GABA nelle vescicole sinaptiche, anche dette trasportatori vescicolari, (McIntire et al., 1997; Bellocchio et al., 2000; Varoqui et al., 2002; Takamori et al., 2001) e allo sviluppo di anticorpi diretti contro di esse è stato possibile

studiare con tecniche immunoistochimiche i terminali sinaptici differenziandoli in base al neurotrasmettitore immagazzinato nelle vescicole e utilizzato per la trasmissione chimica.

La dimostrazione che il trasportatore vescicolare di GABA (VGAT, Vesicular GABA Transporters) è espresso ai terminali che esprimono anche i trasportatori vescicolari di glutammato (VGLUTs, Vesicular Glutamate Transporters) VGLUT1 (Kao, 2004; Conti et al., 2005, Safiulina 2006; Fattorini 2009; Zander et al., 2010; Fattorini et al., 2015), VGLUT2 (Ottem et al., 2004; Boulland 2009) e VGLUT3 (Hioki et al., 2004; Somogyi et al., 2004; Zimmermann et al., 2015) ha dato origine ad una nuova concezione della fisiologia della neurotrasmissione amminoacidergica che, oggi, tiene conto della grande eterogeneità dei terminali sinaptici (El Mestikawy et al., 2011).

La possibilità di liberare sia il glutammato sia il GABA, precedentemente indagata su sinaptosomi stimolati elettricamente (Docherty et al., 1987), è stata definitivamente dimostrata per alcuni terminali sinaptici delle MFs nell'ippocampo (Safiulina et al., 2006; Beltrán e Gutiérrez, 2012; Münster-Wandowski et al., 2013; Valente et al., 2016) e per alcuni terminali sinaptici dei neuroni corticali (Fattorini et al., 2015) ed è, oggi, chiaro che le sinapsi chimiche del SNC possono rilasciare neurotrasmettitori diversi ed avere la capacità di modulare i segnali in accordo con i livelli di attività nel circuito neuronale in cui sono inserite (Gundersen, 2008).

Scopo dello studio

Questo studio è stato eseguito allo scopo di analizzare in microscopia confocale i terminali glutamatergici e GABAergici nel SNC del ratto e del topo, utilizzando come marcatori i due maggiori trasportatori vescicolari del glutammato e del GABA, rispettivamente VGLUT1 e VGAT. In particolare, per le principali strutture anatomo-funzionali della corteccia cerebrale, dello striato, dell'ippocampo, del talamo e del cervelletto è stata quantificata la percentuale di terminali sinaptici nei quali VGLUT1 e VGAT sono colocalizzati.

Materiali e Metodi

Animali

Tutti gli animali sono stati utilizzati in conformità alle direttive del Consiglio della Comunità Europea (2010/63/UE) e alle leggi nazionali (D.L. n.26, 14 Marzo, 2014) e con approvazione della locale autorità veterinaria.

Sono stati utilizzati 4 ratti albi adulti derivanti dal ceppo Sprague Dawley (2-4 mesi di vita; 250-350g) e 3 topi adulti transgenici derivanti dal ceppo C57BL/6 (2-3 mesi di vita; 26-30g) gentilmente forniti dal Dott. Etienne Herzog (Institut interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, Université Bordeaux, Francia). I topi, omozigoti per la modificazione genetica, esprimono la proteina VGLUT1 legata sul carbonio terminale ad un frammento proteico fluorescente (emissione a $\lambda=528$ nm) denominato VENUS (Herzog et al., 2011). VENUS è una variante della proteina gialla fluorescente (YFP, Yellow Fluorescent Protein) che, a sua volta, è una variante prodotta dalla specie *Aequorea victoria* della proteina verde fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein). Grazie alle mutazioni F46L/F64L/M153T/V163A/S175G, VENUS è caratterizzata sia da resistenza a temperatura, pH e composizione ionica del mezzo circostante, sia da elevata emissione di fluorescenza, anche quando legata a proteine interne agli organelli cellulari (Nagai et al., 2002; Padamsey e Jeans, 2012).

Preparazione del tessuto e identificazione delle regioni cerebrali

Tutti gli animali sono stati anestetizzati con un'iniezione intraperitoneale di cloralio idrato al 12% (300 mg/Kg) e perfusi per via transcardiaca con soluzione salina seguita da una soluzione fresca di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato (TF) 0.1M.

Per l'indagine su talamo, striato, ippocampo e corteccia cerebrale, il cranio di ogni animale è stato fissato su opportuno supporto stereotassico (Stoelting Stereotaxic Instrument, UGO BASILE S.r.l., Italia, cod.51600, con adattatore per le diverse specie animali) e il cervello di ogni animale è stato rimosso in blocchi idonei al campionamento delle regioni cerebrali d'interesse secondo le

indicazioni dei rispettivi atlanti anatomici (Paxinos e Watson, 1982 e Paxinos e Franklin, 2001): da -0.3 mm fino a -6.8 mm dal bregma per il ratto; da 0.0 mm a -3.6 mm dal bregma per il topo.

I blocchi ottenuti sono stati post-fissati un giorno per immersione nella soluzione di fissazione utilizzata per la perfusione e tagliati con l'utilizzo di un vibratomo (PELCO easiSlicer, TED PELLA, INC., U.S.A., cod.11000) secondo il piano coronale in sezioni di 50 µm di spessore. Le sezioni ottenute sono state immerse in tampone fosfato salino (TFS) collezionandole in gruppi di 3. Le sezioni intermedie di ogni gruppo sono state reagite per la colorazione di Nissl. Nel dettaglio, dopo essere state montate su vetrini cromo-allumati e lasciate asciugare per un giorno, sono state idratate con una serie di soluzioni di alcol e acqua a concentrazione crescente di acqua e sono state immerse per 2 minuti in una soluzione acquosa di blu di toluidina 1%. Questo colorante si lega all'RNA contenuto nel reticolo endoplasmatico rugoso e nei ribosomi liberi della cellula colorando in blu i corpi cellulari dei neuroni. Le sezioni sono state successivamente sottoposte a disidratazione con una serie di soluzioni di alcol e acqua a concentrazioni crescenti di alcol e immerse in xilolo per 20 minuti. I vetrini sono stati coperti con vetrino copri-oggetto utilizzando il balsamo DPX (Chemicals Merck Millipore, Germania, cod.100579).

Il tessuto è stato analizzato al microscopio ottico (NIKON, ECLIPSE E600, Giappone, dotato di telecamera DSF-Fi2) con lo scopo di individuare le sotto-regioni anatomiche d'interesse, in accordo con i rispettivi atlanti anatomici (Paxinos e Watson, 1982 e Paxinos e Franklin, 2001). Per ogni sotto-regione sono state individuate almeno due sezioni idonee provenienti da due gruppi di 3 sezioni adiacenti, uno più rostrale ed uno successivamente più caudale. Da ognuno di questi due gruppi è stata selezionata una sezione per la reazione di immunofluorescenza, per un totale di due sezioni per ogni animale.

Dopo la rimozione, il cervelletto è stato separato sagittalmente nei due emisferi. Questi sono stati post-fissati un giorno per immersione nella soluzione di fissazione utilizzata per la perfusione e tagliati con l'utilizzo di un vibratomo secondo il piano sagittale in sezioni di 50 µm di spessore che sono state immerse in TFS. Alcune sezioni sono state sottoposte a colorazione di Nissl per

controllare lo stato di conservazione e integrità del tessuto e due sezioni per ogni animale sono state destinate agli esperimenti di immunofluorescenza.

Immunofluorescenza

Le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora con una soluzione di siero normale di capra neonata (NBCS) al 10% e Triton X-100 allo 0.2% in TFS e successivamente per tutta la notte con una soluzione di TFS contenente l'anticorpo primario diretto contro il trasportatore vescicolare di acido γ -amino butirrico (GABA) VGAT (anti-VGAT Synaptic System, Germania, cod. 131003; 1:500 per il ratto e 1:400 per il topo; Blazquez-Llorca et al., 2010; García-Marín et al., 2010; Takamori et al., 2000) e, solo negli esperimenti condotti nel ratto, anche l'anticorpo diretto contro il trasportatore vescicolare di glutammato VGLUT1 (anti-VGLUT1 Millipore, U.S.A., cod. AB5905; 1:1000; Melone et al., 2005; García-Marín et al., 2010). Il giorno successivo, dopo numerosi lavaggi in TFS, le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente per 1.5 ore con una soluzione di TFS contenente l'anticorpo secondario, diretto contro l'anticorpo anti-VGAT, coniugato al fluoroforo CY3 (Jackson ImmunoResearch, U.S.A., cod. 711-166-152; 1:250; emissione a $\lambda=570$ nm) e, solo negli esperimenti condotti nel ratto, anche l'anticorpo secondario, diretto contro l'anticorpo anti-VGLUT1, coniugato al fluoroforo Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch, U.S.A., cod. 706-546-148; 1:250; emissione a $\lambda=519$ nm). I tessuti provenienti dai topi transgenici che esprimono VGLUT1^{Venus}, quando eccitati, mostrano una brillante fluorescenza nello spettro del verde registrabile a 520 nm di emissione (Herzog et al., 2011).

Alcune sezioni sono state processate con un solo anticorpo primario ed entrambi gli anticorpi secondari o con entrambi gli anticorpi primari ed un solo anticorpo secondario per controllare l'assenza di interazioni tra i segnali relativi agli anticorpi utilizzati.

Le sezioni sono state infine lavate con TFS, montate su vetrini e coperte con un vetrino copri-oggetto utilizzando una soluzione di propile-gallato 0.1M (Sigma-Aldrich, Germania, cod. 02370) in soluzione di glicerolo (Sigma-Aldrich, Germania, cod. G9012):TFS (9:1).

Microscopia confocale

I campi microscopici sono stati così campionati:

- Per la corteccia cerebrale: dallo *strato II-III* della corteccia cerebrale somatosensitiva primaria S1 e della corteccia cerebrale agranulare mediale motoria primaria M1 (6 immagini/sezione; 1 sezione/animale; e 4 animali per il ratto; 2 sezioni/animale; 3 animali per topo);
- Per lo striato: dal nucleo caudato putamen (CPu) (6 immagini/sezione; 2 sezioni/animale; 3 animali);
- Per l'ippocampo: dagli strati *molecolare* e *polimorfico* del giro dentato (DG), *oriens*, *lucido* e *radiato* della regione CA3, *molecolare* e *radiato* della regione CA1 (3 immagini/strato/sezione; 2 sezioni/animale; 3 animali);
- Per il talamo: dai nuclei anteriori (anterodorsale(AD), anteroventrale (AV)), dal nucleo ventrolaterale (VL), dai nuclei della linea mediana (paraventricolare (PVA), parateniale (PT), interanteromediale (IAM), romboide (Rh), reuniens (Re)), dai nuclei intralaminari (centrale mediale (CM), centrale laterale (CL), parafascicolare (PF)), dal nucleo mediodorsale (MD), dai nuclei ventroposteriori (ventroposterolaterale (VPL), ventroposteromediale (VPM)) e dai nuclei caudali (genicolato dorsale laterale (DLG), genicolato mediale ventrale (MGV)) (3 immagini/nucleo/sezione; 2 sezioni/animale; 3 animali);
- Per il cervelletto: dagli strati *molecolare* e *granulare* della corteccia cerebellare (6 immagini/strato/sezione; 2 sezioni/animale; 3 animali).

Le immagini di dimensione 512x512 pixel (ratto: 79.34x79.34 μm , 1 pixel = 154.97 nm; topo: 68.01x68.01 μm , 1 pixel = 132.83 nm) sono state acquisite utilizzando un obiettivo ad immersione ad olio 63X (apertura numerica: 1.4; pinhole 1 unità di Airy) con un microscopio confocale (Leica Microsystems, TCS-SP2, Germania) dotato di laser ad argon e di laser ad elio/neon.

E' stata utilizzata una lunghezza d'onda di 488 nm per eccitare il fluoroforo Alexa488 e il frammento VENUS legato a VGLUT1 nel topo, e una lunghezza d'onda di 543 nm per eccitare il fluoroforo CY3. I segnali emessi sono stati acquisiti in un piano confocale dove la penetrazione

dell'anticorpo e la relativa immunoreattività risulta migliore e sempre al di sotto di 1.8 μm rispetto alla superficie della sezione (Melone et al., 2005). I valori di “*gain*” e “*offset*” sono stati impostati al fine di equilibrare l'intensità del segnale rispetto alla sua saturazione e al rumore di fondo. Per migliorare ulteriormente il rapporto tra il segnale e il rumore di fondo è stata utilizzata la funzione “*average*” applicando 10 sovrapposizioni per ogni immagine al tessuto del ratto e 4 sovrapposizioni per ogni immagine al tessuto del topo.

I canali verde e rosso sono stati acquisiti in sequenza per assicurare assenza di interferenza.

La specificità del segnale è stata verificata con acquisizioni di immagini dalle sezioni controllo processate con un solo anticorpo primario ed entrambi gli anticorpi secondari o con entrambi gli anticorpi primari ed un solo anticorpo secondario.

Elaborazione delle immagini, raccolta e analisi dei dati

Ogni immagine è stata processata con il software IMAGEJ (NIH, U.S.A., v.1.4). Per migliorare il contrasto e minimizzare la fusione dei profili marcati immunoreattivi (puncta) corrispondenti a terminali sinaptici contenenti specificamente VGLUT1 (puncta VGLUT1+) e VGAT (puncta VGAT+), ogni immagine è stata deconvoluta utilizzando il plug-in “Iterative Deconvolve 3D” (DAMAS3; 20 iterazioni; Dougherty, 2005) e successivamente binarizzata. I canali sono stati quindi sovrapposti e su ogni immagine sono stati selezionati 4 tasselli di dimensioni circa 30x30 μm (in totale: 96 per corteccia cerebrale del ratto; 144 per corteccia cerebrale del topo, 144 per striato e cervelletto del ratto e del topo; 72 per ippocampo e talamo del ratto e del topo).

Per ogni tassello, i due canali sono stati analizzati individualmente per identificare il numero (N) delle puncta VGLUT1+ (verdi) e VGAT+ (rosse) utilizzando il plug-in “analyze particles”.

Infine i canali sono stati sovrapposti e le aree di condivisione dei segnali (puncta gialle) sono state analizzate. Solo le puncta gialle corrispondenti alla sovrapposizione totale di una puncta verde in una puncta rossa, o viceversa, sono state identificate e manualmente contate come colocalizzazioni tra VGLUT1 e VGAT (Figura 1).

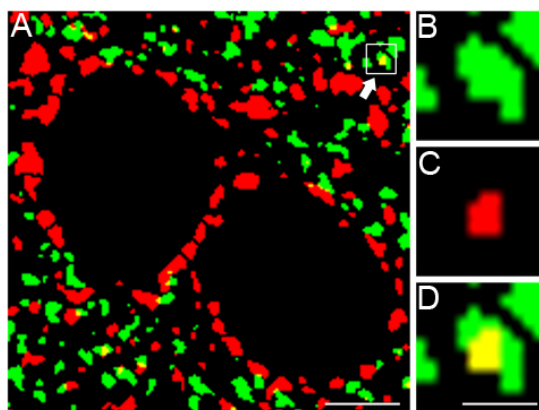


Figura 1. Dettaglio di un tassello di un campo microscopico acquisito dallo strato II-III della corteccia cerebrale M1 di ratto (A). La freccia mostra colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT, ingrandita in D, mentre B e C mostrano rispettivamente il segnale di VGLUT1 (verde) e di VGAT (rosso). Solo le puncta gialle corrispondenti ad una totale sovrapposizione di una puncta rossa in una verde (come in questo caso), o viceversa, sono state considerate come colocalizzazioni. Scala metrica: 5 μm per A; 2 μm per B, C e D.

La percentuale di colocalizzazione è stata calcolata in rapporto al numero totale di puncta VGLUT1+ e al numero totale di puncta VGAT+. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., U.S.A., v. 6.01).

Risultati

Ratto

Lo studio in microscopia confocale delle sezioni reagite in immunofluorescenza ha permesso di studiare la colocalizzazione di VGLUT1 e VGAT in ogni sotto-regione analizzata del SNC del ratto (Figura 2).

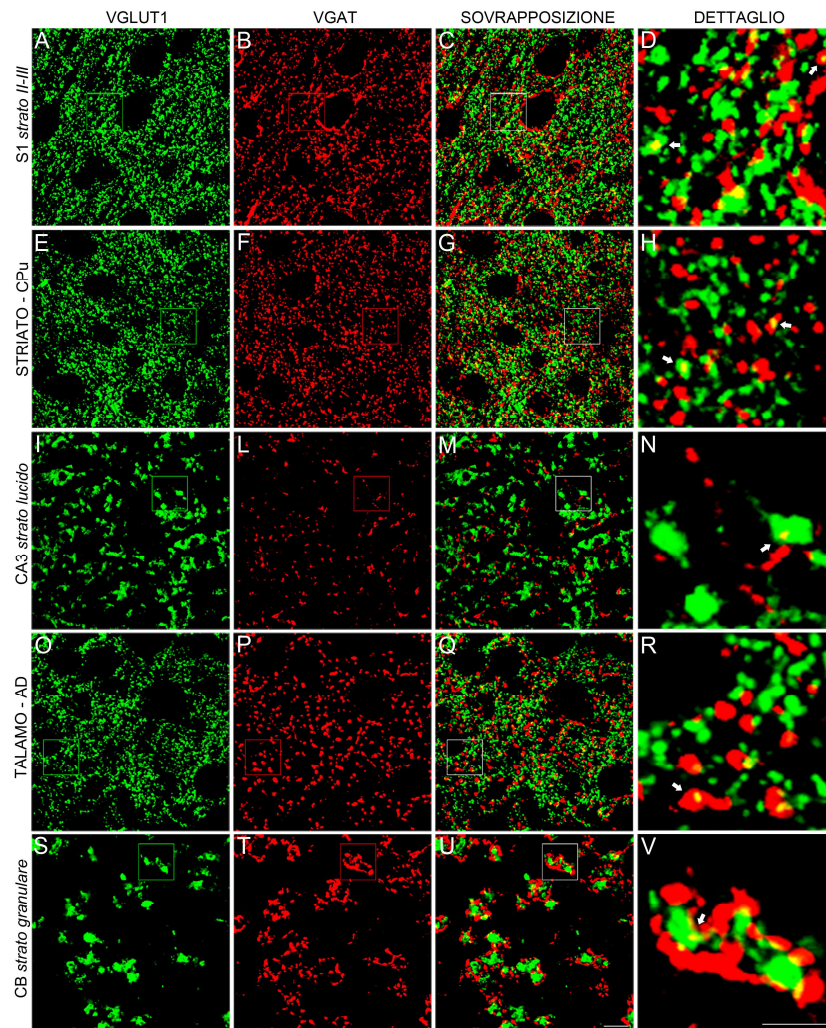


Figura 2. Esempi di immunofluorescenza di VGLUT1 (A,E,I,O,S) e VGAT (B,F,L,P,T) nella corteccia cerebrale (S1, strato II-III), nello striato (CPu), nell'ippocampo (strato lucido della regione CA3), nel talamo (nucleo AD) e nel cervelletto (strato granulare) del ratto. Dalle immagini sovrapposte (C,G,M,Q,U) è stato ingrandito un dettaglio (D, H, N, R, V) nel quale le frecce indicano esempi di colocalizzazione. Scala metrica: 5 μ m per D,H,N,R,V; 10 μ m per gli altri.

L'analisi eseguita ha rivelato l'esistenza di una modesta e poco differenziata percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale dei terminali sinaptici VGLUT1+ e VGAT+ per tutte le sotto-regioni studiate.

I dati ottenuti rappresentano una mappatura della percentuale di terminali sinaptici nei quali VGLUT1 e VGAT colocalizzano in tutte le sotto-regioni studiate, anatomicamente distinte all'interno delle aree cerebrali d'interesse (Figura 3).

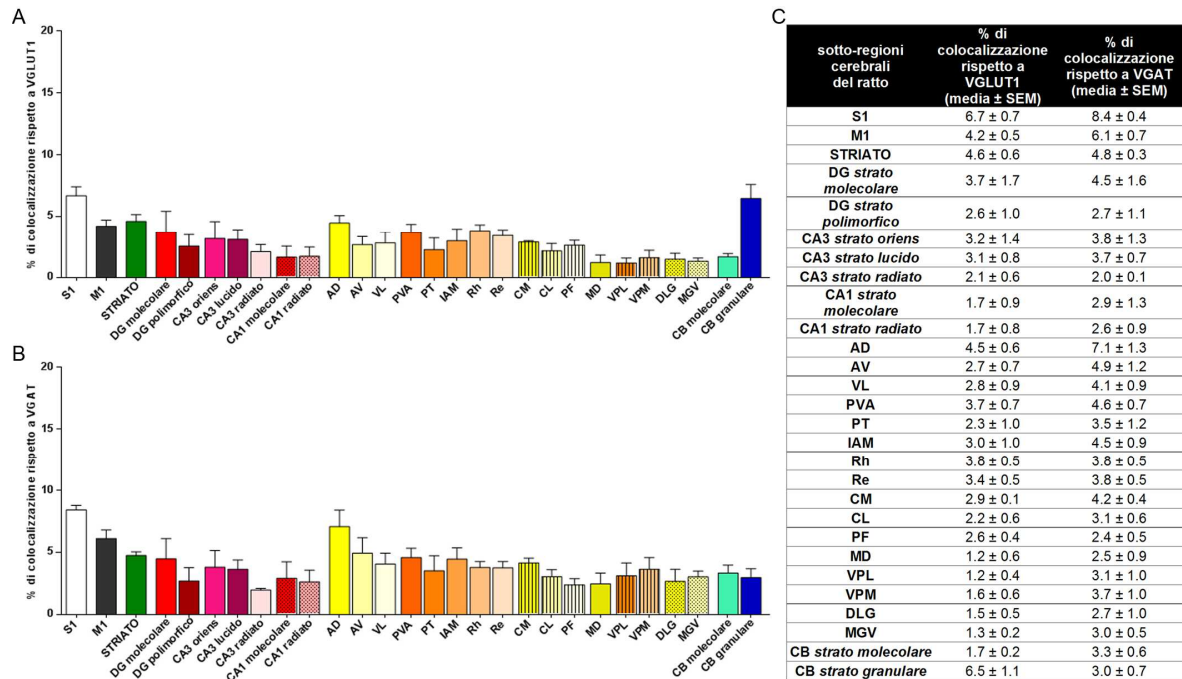


Figura 3. I grafici illustrano la percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale delle punta VGLUT1+ (A) e al totale delle punta VGAT+ (B) in tutte le sotto-regioni del SNC del ratto analizzate. I valori (media ± SEM) sono riportati in tabella (C). I dati derivano dallo studio su 4 animali per S1 e M1 e su 3 animali per tutte le altre sotto-regioni analizzate.

L'elaborazione dei dati raccolti ha rivelato che il grado di colocalizzazione delle due proteine è paragonabile tra tutte le aree studiate del SNC del ratto (Figura 4).

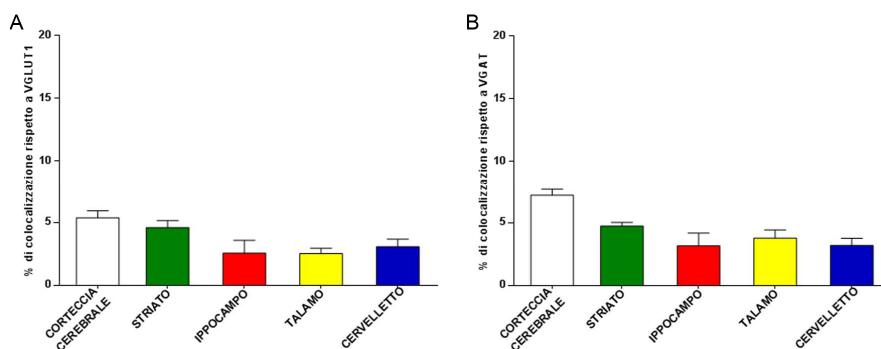


Figura 4. Analisi della percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale delle punta VGLUT1+ (A) e al totale delle punta VGAT+ (B) nelle regioni del SNC del ratto. Nel dettaglio le punta VGLUT1+ che esprimono anche VGAT sono $5.4 \pm 0.5\%$ nella corteccia cerebrale ($N = 62490$), $4.6 \pm 0.6\%$ nello striato ($N = 36717$), $2.6 \pm 1.0\%$ nell'ippocampo ($N = 107602$), $2.5 \pm 0.4\%$ nel talamo ($N = 247427$) e $3.1 \pm 0.6\%$ nel cervelletto ($N = 46995$) e le punta VGAT+ che esprimono anche VGLUT1 sono $7.2 \pm 0.5\%$ nella corteccia cerebrale ($N = 45382$), $4.8 \pm 0.3\%$ nello striato ($N = 35754$), $3.2 \pm 1.0\%$ nell'ippocampo ($N = 89574$), $3.8 \pm 0.7\%$ nel talamo ($N = 165940$) e $3.2 \pm 0.6\%$ nel cervelletto ($N = 34986$). Il grafico esprime la media ± SEM.

Topo

La colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT ai terminali sinaptici cerebrali è stata studiata anche nel cervello dei topi transgenici VGLUT1^{Venus} sulla base dell'analisi delle sezioni reagite in immunofluorescenza (Figura 5).

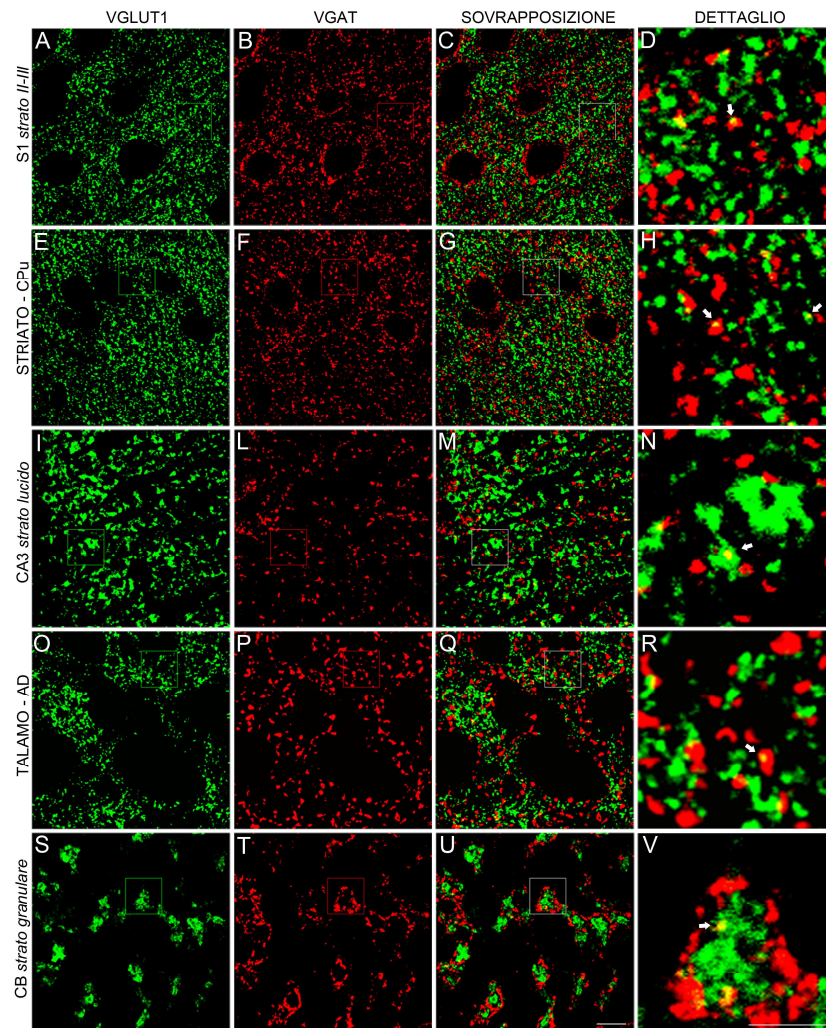


Figura 5. Esempi di immunofluorescenza di VGLUT1 (A,E,I,O,S) e VGAT (B,F,L,P,T) nella corteccia cerebrale (S1, strato II-III), nello striato (CPu), nell'ippocampo (strato lucido della regione CA3), nel talamo (nucleo AD) e nel cervelletto (strato granulare) del topo. Dalle immagini sovrapposte (C,G,M,Q,U) è stato ingrandito un dettaglio (D,H,N,R,V) nel quale le frecce indicano esempi di colocalizzazione. Scala metrica: 5 μ m per D,H,N,R,V; 10 μ m per gli altri pannelli.

Lo studio in microscopia confocale sul cervello dei topi transgenici VGLUT1^{Venus} ha permesso di quantificare, per tutte le sotto-regioni cerebrali studiate, la percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale dei terminali sinaptici VGLUT1+ e VGAT+.

I dati ottenuti hanno rivelato l'esistenza di una piccola percentuale di terminali sinaptici nei quali VGLUT1 e VGAT colocalizzano in tutte le strutture analizzate (Figura 6).

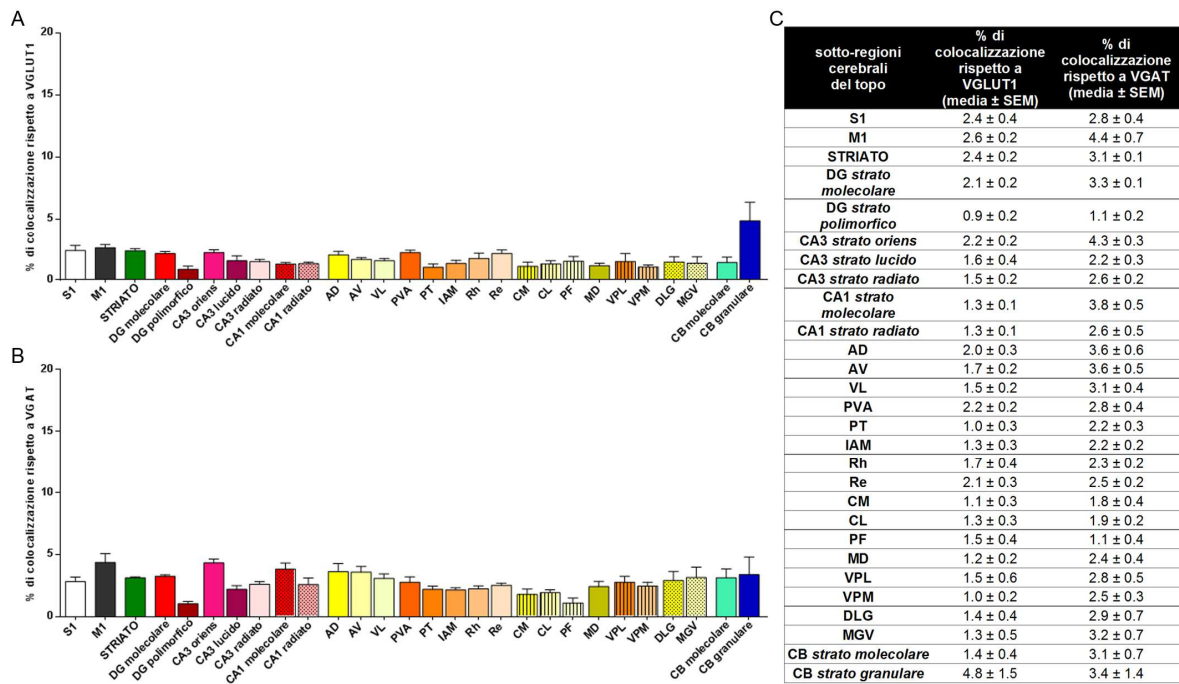


Figura 6. I grafici illustrano la percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale delle punta VGLUT1+ (A) e al totale delle punta VGAT+ (B) in tutte le sotto-regioni del SNC del topo analizzate. I valori (media ± SEM) sono riportati in tabella (C). I dati derivano dallo studio su 3 animali.

L'elaborazione dei dati raccolti ha evidenziato che, anche nel SNC del topo, il grado di colocalizzazione tra le due proteine è paragonabile tra tutte le aree cerebrali studiate (Figura 7).

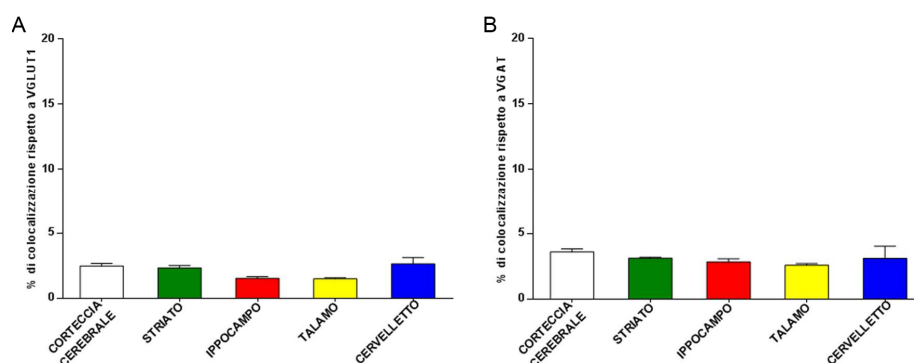


Figura 7. Analisi della percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT rispetto al totale delle punta VGLUT1+ (A) e al totale delle punta VGAT+ (B) nelle regioni del SNC del topo. Nel dettaglio le punta VGLUT1+ che esprimono anche VGAT sono $2.5 \pm 0.2\%$ nella corteccia cerebrale ($N = 80394$), $2.4 \pm 0.2\%$ nello striato ($N = 35920$), $1.5 \pm 0.1\%$ nell'ippocampo ($N = 132804$), $1.5 \pm 0.1\%$ nel talamo ($N = 221713$) e $2.7 \pm 0.5\%$ nel cervelletto ($N = 53469$) e le punta VGAT+ che esprimono anche VGLUT1 sono $3.6 \pm 0.2\%$ nella corteccia cerebrale ($N = 56828$), $3.1 \pm 0.1\%$ nello striato ($N = 26865$), $2.8 \pm 0.2\%$ nell'ippocampo ($N = 72876$), $2.6 \pm 0.1\%$ nel talamo ($N = 128569$) e $3.1 \pm 0.9\%$ nel cervelletto ($N = 29154$). Il grafico esprime la media ± SEM.

Discussione

Metodo

In questo studio è stata utilizzata la microscopia confocale come metodo per indagare il grado di colocalizzazione di VGLUT1 e VGAT nel SNC del ratto e del topo, allo scopo di ampliare le conoscenze relative alla loro co-espressione ai terminali sinaptici in diverse regioni del cervello.

L'utilizzo della microscopia confocale consente di registrare più segnali fluorescenti emessi da un campione in uno stesso piano di fuoco annullando gli effetti dovuti allo spessore della sezione caratteristici delle analisi eseguite con microscopia a fluorescenza tradizionale e restituisce immagini ad una più alta risoluzione di una vasta area di campione analizzato. Queste caratteristiche intrinseche, unite alla possibilità di acquisire molte immagini in tempi ridotti e al continuo innovativo sviluppo di software e plug-in che ne consentono l'elaborazione, conferiscono al metodo la capacità di contribuire, in maniera determinante, al veloce progresso nella comprensione di molti fenomeni biologici. L'utilizzo di questo metodo per la visualizzazione delle proteine che risiedono nelle strutture intracellulari e lo studio della loro colocalizzazione con anticorpi ben caratterizzati, permette, a fronte della scelta di opportuni marcatori, di sviluppare importanti analisi negli studi di biologia cellulare (Bolte e Cordelières, 2006). La maggior parte degli studi di colocalizzazione richiede un approccio personalizzato a seconda della morfologia delle strutture analizzate ed in funzione del limite di risoluzione del metodo il quale, considerata la distribuzione su scala nanometrica dei fluorofori, implica un'incertezza sulle dimensioni fisiche e sulla localizzazione di oggetti di piccole dimensioni (Bolte e Cordelières, 2006). E' pertanto necessaria una ottimizzazione del metodo più accurata possibile e una corretta valutazione ed interpretazione dei risultati che emergono dalla sua applicazione.

L'analisi del grado di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT è stata eseguita utilizzando anticorpi primari e secondari ben caratterizzati e una procedura di immuofluorescenza convalidata in altri studi analoghi (Fattorini et al., 2009; 2015). E' stata verificata la specificità dei segnali di fluorescenza emessi dal campione. Regolando accuratamente i molteplici parametri del microscopio

e del software di gestione dello stesso, è stato acquisito un elevato numero di immagini (si veda la Sezione Materiali e Metodi). Inoltre, sono stati utilizzati plug-in convalidati per l'elaborazione delle immagini, e le colocalizzazioni sono state identificate manualmente, considerando tali solo le sovrapposizioni totali dei segnali di immunoreattività di VGLUT1 e di VGAT e scartando quelle parziali. Lo studio eseguito ha permesso di analizzare un grande numero di terminali marcati per ogni area cerebrale studiata (si veda la Sezione Risultati). I risultati hanno restituito valori percentuali di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT nella corteccia somatosensitiva S1 del ratto (7% sul totale dei terminali VGLUT1+ e 8% sul totale dei terminali VGAT+) che verificano e confermano il grado di co-espressione delle due proteine già dimostrato per questa area cerebrale del SNC del ratto con le stesse procedure in studi precedenti (Fattorini et al, 2009; 2015).

VGLUT1 e VGAT

Molteplici eventi che hanno luogo al terminale pre-sinaptico concorrono a modulare le risposte sinaptiche regolando la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore, come ad esempio l'attivazione del terminale pre-sinaptico, la concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} , la catena di reazioni mediate dalle proteine che cooperano nel rilascio del neurotrasmettitore dalle vescicole sinaptiche, il numero di vescicole liberate e il loro sincronismo, la piccola variabilità delle vescicole in dimensioni (40-50nm di diametro) e in contenuto "quantale" in neurotrasmettitore (50-100mM) (Conti e Weinberg, 1999; Gasnier, 2000; Edwards, 2007). Un meccanismo essenziale coinvolto nel rilascio del neurotrasmettitore è costituito dal suo immagazzinamento nelle vescicole sinaptiche del terminale pre-sinaptico da parte dei trasportatori vescicolari. Questi hanno proprietà simili ai canali ionici ed operano un trasporto attivo mediato dalla pompa H^+ -V-ATPasi. Il glutammato viene accumulato nelle vescicole ad opera dei tre trasportatori vescicolari VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3, appartenenti ad una stessa famiglia di proteine la cui attività dipende principalmente dal gradiente elettrico ai lati della membrana vescicolare ($\Delta\Psi$). VGLUT1 è maggiormente espresso nel telencefalo, mentre VGLUT2 nel diencefalo. VGLUT1 e VGLUT2 mostrano una distribuzione

complementare nel cervello di mammiferi adulti. Entrambi sono responsabili dell'immagazzinamento di glutammato nei neuroni eccitatori e del suo rilascio per esocitosi dai terminali deputati alla trasmissione eccitatoria glutammatergica. VGLUT3, invece, è poco frequente nel cervello ed è espresso in neuroni le cui terminazioni sinaptiche non rilasciano primariamente glutammato e sono responsabili della trasmissione GABAergica, monoaminergica e colinergica (Fremeau et al., 2004a; Boulland et al., 2004; Takamori, 2006).

I terminali sinaptici glutammatergici si distinguono anche funzionalmente e la caratterizzazione dell'organizzazione molecolare può chiarire il loro impatto sullo stato funzionale dei circuiti cerebrali. La probabilità di rilascio è bassa per i terminali esprimenti VGLUT1 e alta per quelli esprimenti VGLUT2. Poiché le sinapsi con basso potenziale di rilascio hanno alto potenziale di plasticità, l'espressione di VGLUT1 è correlata ad una maggiore plasticità sinaptica (Conti et al., 2005).

Il GABA è trasportato nelle vescicole sinaptiche dal trasportatore vescicolare VGAT, appartenente ad una famiglia di proteine la cui attività dipende principalmente dal gradiente di concentrazione di H⁺ ai lati della membrana vescicolare (Δ pH). VGAT si trova distribuito in tutto il cervello ed è responsabile della trasmissione inibitoria GABAergica (McIntire et al., 1997; Sagnè et al., 1997; Takamori et al., 2000).

Nonostante sia stata ampiamente dimostrata la localizzazione di VGAT in terminali sinaptici che formano sinapsi simmetriche, di VGLUT1 e VGLUT2 in terminali sinaptici che formano sinapsi asimmetriche e di VGLUT3 in entrambi i tipi di sinapsi (Chaudhry et al., 1998; Fremeau et al., 2001; 2002; 2004b; Kaneko et al., 2002) è ormai noto che non c'è sempre una netta segregazione tra i diversi sistemi vescicolari di trasporto di glutammato e GABA (Boulland et al., 2004; 2009; Conti et al., 2005; Seal e Edwards, 2006; Fattorini et al., 2009; 2015; Münster-Wandowski et al., 2016; Tritsch et al., 2016).

E' stato dimostrato in microscopia confocale che i due maggiori trasportatori vescicolari del glutammato e del GABA, VGLUT1 e VGAT, sono co-espressi in una porzione di terminali

sinaptici nella corteccia cerebrale di ratto adulto (10% dei terminali immunoreattivi per VGLUT1+ e 9% dei terminali immunoreattivi per VGAT+) (Figura 8-A). Studi di microscopia elettronica a trasmissione hanno svelato che i terminali che co-esprimono VGLUT1 che VGAT formano sia sinapsi simmetriche che asimmetriche (Figura 8-B-C). Studi biochimici di immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro VGLUT1 e contro VGAT hanno permesso di immuno-isolare le vescicole sinaptiche della corteccia cerebrale del ratto ed hanno dimostrato che, almeno in parte, le due proteine coesistono nella stessa vescicola (Figura 8-D-E-F) (Fattorini et al., 2009).

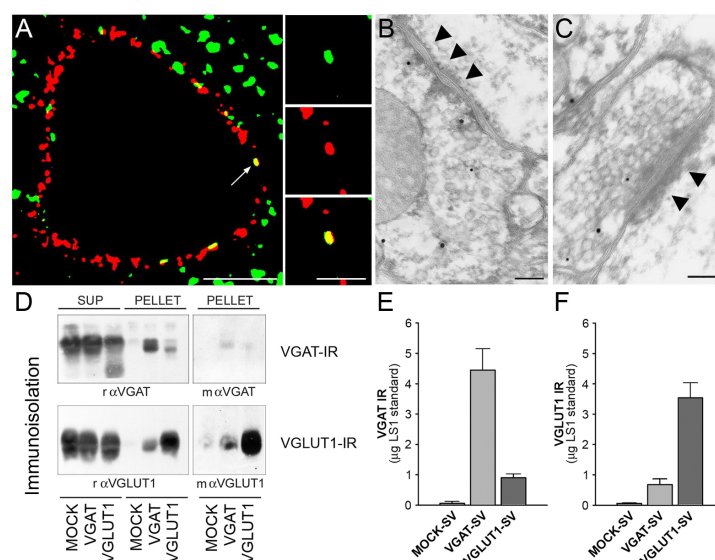


Figura 8. Evidenza della co-espressione di VGLUT1 e VGAT nelle sinapsi corticali del ratto adulto. Al microscopio confocale (A) si vede un esempio di colocalizzazione (indicato dalla freccia) tra puncta VGLUT1+ (verdi) e puncta VGAT+ (rosso). Scala metrica: 5 μ m per il pannello grande; 2 μ m per i pannelli piccoli che mostrano un ingrandimento del dettaglio della colocalizzazione. Al microscopio elettronico a trasmissione sono evidenti terminali che esprimono VGLUT1 (punti piú grandi) e VGAT (punti piú piccoli) che fanno sia sinapsi simmetriche (B) che asimmetriche (C). Scala metrica: 0.12 μ m per B e 0.15 μ m per C. L'immunoreattività degli anticorpi diretti contro VGLUT1 e VGAT nelle frazioni derivate dalla immunoprecipitazione delle vescicole sinaptiche glutammatergiche e GABAergiche con anticorpi di coniglio diretti contro VGAT (r α VGAT) e contro VGLUT1 (r α VGLUT1) (D) e la relativa quantificazione densitometrica (E, F) evidenziano la co-espressione di VGLUT1 e VGAT nelle vescicole immunoisolate. Immunoglobuline IgGs di coniglio (Mock) sono state utilizzate come controllo. Modificata da Fattorini et al., 2009.

L'utilizzo in microscopia confocale di un anticorpo anti-VGAT che si lega al dominio intravescicolare della proteina (Martens et al., 2008) ha permesso di svelare che, nei terminali glutammatergici, le vescicole sinaptiche che co-esprimono VGLUT1 e VGAT partecipano al ciclo eso-endocitotico (figura 9-A) (Fattorini et al., 2009). Studi elettrofisiologici hanno dimostrato che da alcuni terminali sinaptici avviene il rilascio sia del glutammato sia del GABA ed hanno messo in

luce differenti proprietà funzionali delle sinapsi deputate a questo tipo di trasmissione. Sono state eseguite stimolazioni e registrazioni da coppie di neuroni sinapтически legati, in colture di neuroni corticali di ratto. Da questi studi è emerso che una quota di risposte, sia autaptiche sia sinaptiche, non viene inibita dopo blocco selettivo dei recettori AMPA e NMDA (con CNQX e APV) o GABA_A (con bicucullina) dimostrando che da alcuni terminali pre-sinaptici vengono liberati sia il glutammato sia il GABA. Inoltre, l'ampiezza dei segnali relativi a queste sinapsi 'miste' è risultata inferiore all'ampiezza dei segnali attribuibili a sinapsi glutamatergiche e GABAergiche 'pure', le cui risposte sono totalmente inibite dal blocco dei rispettivi recettori ionotropici (Figura 9-B, 9-C, 9-D, 9-E, 9-F). Esperimenti di plasticità a breve termine hanno rivelato che, mentre le sinapsi glutamatergiche e GABAergiche pure vanno incontro rispettivamente a facilitazione (PPF, Paired-Pulse Facilitation) e depressione (PPD, Paired-Pulse Depression), le sinapsi miste vanno incontro a depressione (PPD) mostrando un profilo funzionale simile a quello dei neuroni GABAergici (Figura 9-G) (Fattorini et al., 2015).

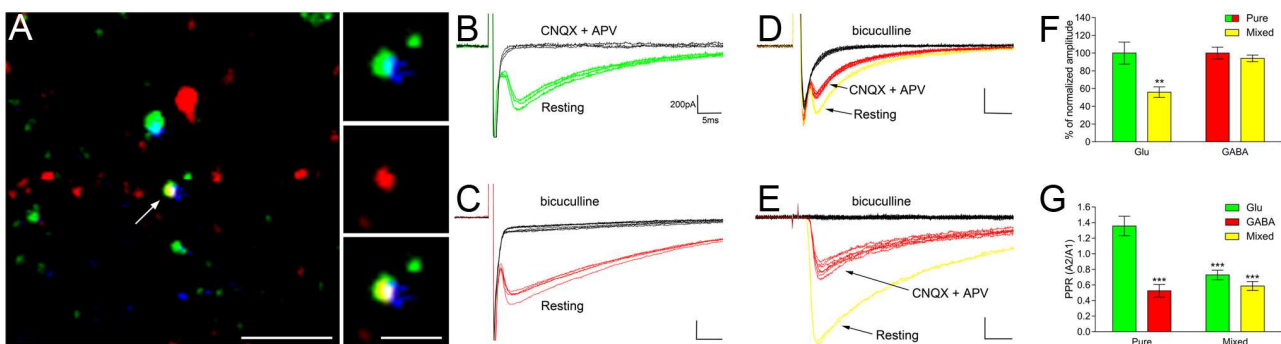


Figura 9. Studi di co-liberazione di glutammato e GABA in colture di neuroni corticali di ratto. In microscopia confocale (A) si evidenzia la colocalizzazione (indicata dalla freccia) tra puncta VGLUT1+ (verde) e VGAT+ (rosso; riconosciuto da anticorpo anti-VGAT per il dominio intravescicolare) in sinapsi glutamatergiche identificate dalla parziale sovrapposizione di puncta VGLUT1+ (verde) e PSD-95+ (blu). Scala metrica: 5 μ m per il pannello più grande; 2 μ m per i pannelli piccoli che mostrano un ingrandimento del dettaglio della colocalizzazione. I grafici derivanti dagli studi elettrofisiologici mostrano le risposte registrate da sinapsi glutamatergiche pure (B), GABAergiche pure (C) e da sinapsi miste autaptiche (D) e sinaptiche (E) dopo blocco dei recettori ionotropici per il glutammato e il GABA. L'analisi ha evidenziato che le risposte evocate dalle trasmissioni miste sono di ampiezza inferiore alle risposte registrate dalle sinapsi pure (F). La quantificazione della plasticità a breve termine (PPR=Paired-Pulse Ratio) delle sinapsi glutamatergiche (in verde, a sinistra), GABAergiche (in rosso), glutamatergiche residue dalle sinapsi miste (in verde, a destra), e miste (in giallo) evidenzia, per la trasmissione 'mista', un profilo funzionale simile alla trasmissione GABAergica (G). Modificata da Fattorini et al., 2009, 2015.

Sono stati condotti studi in culture di cellule granulari ippocampali di topo ed è emerso che il GABA co-liberato dai terminali glutammatergici delle MFs esercita un'azione autaptica inibitoria sul rilascio di glutammato mediata dai recettori metabotropici GABA_B, modulando la plasticità a breve termine di questi terminali sinaptici (Valente et al., 2016).

Gli studi in questo campo hanno svelato che sia la liberazione di entrambi i neurotrasmettitori, glutammato e GABA, da alcuni terminali sinaptici, sia la percentuale di terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT sono correlati all'attività neuronale (Gutiérrez et al., 2000; 2016; Erickson et al., 2006; Fattorini et al., 2015).

Nella ricerca dei meccanismi molecolari che possano chiarire la funzione della co-espressione di VGLUT1 e VGAT nelle stesse vescicole in alcuni terminali sinaptici risulta importante valutare la cinetica del trasporto attivo del glutammato e del GABA all'interno delle vescicole sinaptiche che è diversamente regolata dai gradienti elettro-chimici degli ioni presenti ai due lati della membrana delle vescicole (Egashira et al., 2016; Farsi et al., 2016). Sulla base delle evidenze sperimentali fino ad ora raccolte che correlano la colocalizzazione di VGLUT1 e VGAT e il co-rilascio di glutammato e GABA (Safiulina et al., 2006; Fattorini et al., 2009; 2015; Beltrán e Gutiérrez, 2012; Münster-Wandowski et al., 2013), la regolazione dell'attività di VGLUT1 e VGAT suggerisce che entrambi i trasportatori operino nell'immagazzinamento del relativo neurotrasmettitore con un meccanismo di mutua regolazione in risposta alle variazioni delle concentrazioni ioniche ai lati della membrana vescicolare.

Significato funzionale

I dati fino ad oggi raccolti relativi alla co-espressione di VGLUT1 e VGAT in alcuni terminali sinaptici cerebrali non sono sufficienti per stimare la rilevanza del fenomeno nella funzionalità cerebrale, né per correlare il fenomeno a specifici circuiti cerebrali. Infatti, sebbene la presenza di alcuni terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT sia stata descritta nella corteccia cerebrale (Fattorini et al., 2009; 2015), nell'ippocampo e nel cervelletto del ratto (Safiulina et al.,

2006; Zander et al., 2010), non è nota la percentuale di terminali che co-esprimono le due proteine per tutte le strutture analizzate, né sono state studiate altre aree cerebrali. Inoltre, a parte alcune osservazioni nelle cellule bipolari della retina di gatto (Kao et al., 2004), non si conosce l'espressione e la distribuzione del fenomeno nel cervello degli altri mammiferi.

Questo studio fornisce per la prima volta un'estensione delle conoscenze del fenomeno della co-espressione di VGLUT1 e VGAT ai terminali sinaptici glutamatergici e GABAergici di ampie aree e sotto-regioni anatomo-funzionalmente distinte nel cervello del ratto e del topo.

I dati ottenuti svelano l'esistenza di una quota di terminali sinaptici sia glutamatergici che GABAergici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT in tutti i distretti anatomo-funzionali presi in considerazione all'interno delle regioni cerebrali studiate, sia nel SNC del ratto che del topo. Lo studio restituisce per entrambe le specie una mappatura cerebrale dettagliata della percentuale dei terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT.

L'analisi eseguita, oltre a contribuire ad una ulteriore caratterizzazione del modello di topo transgenico VGLUT1^{Venus}, evidenzia che la percentuale di terminali che co-esprimono VGLUT1 e VGAT nel cervello del topo è inferiore al 5% dei terminali glutamatergici e GABAergici in tutte le strutture studiate. D'altra parte, in condizioni basali ed allo stesso stadio di sviluppo dell'animale, la percentuale di colocalizzazione tra VGLUT1 e VGAT raggiunge il 7% dei terminali glutamatergici e l'8% dei terminali GABAergici nella corteccia cerebrale del ratto, suggerendo una maggiore espressione del fenomeno in questa specie.

Questo studio rivela che, in condizioni basali, in tutte le strutture analizzate nel cervello del ratto e del topo, la percentuale di terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT è modesta. E' importante valutare questi risultati alla luce del fatto che la percentuale di terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT si riduce se diminuisce l'attività neuronale e aumenta a seguito di riduzione dell'inibizione spontanea dell'attività neuronale (Fattorini et al., 2015). Quindi, il fenomeno assume dimensioni maggiori in funzione del grado di attività neuronale.

La presenza diffusa nel cervello di terminali sinaptici che co-esprimono VGLUT1 e VGAT e gli adattamenti manifestati in relazione all'attività neuronale suggeriscono che il fenomeno possa svolgere un ruolo importante nella regolazione della trasmissione sinaptica e nell'omeostasi delle sinapsi eccitatorie e inibitorie in tutto il cervello e che una quota di terminali sinaptici, co-esprimenti sia VGLUT1 sia VGAT, sia stata evolutivamente preservata in tutte le regioni del cervello dei mammiferi per preservare la fisiologica funzionalità cerebrale.

E' interessante considerare che uno squilibrio tra la trasmissione eccitatoria ed inibitoria può concorrere all'insorgenza di alcune patologie ancora poco note, come l'autismo (ASD, Autism Spectrum Disorder) (Lee et al., 2016; Ford et al., 2016; Zheng et al., 2016), la schizofrenia (Hoftman et al., 2016), l'ansia (Crestani et al., 1999), l'epilessia (Bonansco, 2016) e l'Alzheimer (Eichler e Meier, 2008).

In conclusione, questo studio estende le conoscenze relative al fenomeno di co-espressione dei due maggiori trasportatori vescicolari di glutammato e GABA nel tessuto cerebrale e sostiene gli studi futuri volti a chiarire il contributo del fenomeno al fisiologico svolgimento delle funzioni cognitive cerebrali e il suo potenziale ruolo nell'insorgenza di condizioni patologiche correlate a squilibri tra la trasmissione eccitatoria ed inibitoria.

Bibliografia

- Aubrey K.R. (2016) Presynaptic control of inhibitory neurotransmitter content in VIAAT containing synaptic vesicles. *Neurochem. Int.* 98:94-102.
- Bellocchio E.E., Reimer R.J., Fremeau R.T., Edwards R.H. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289(5481):957-60.
- Beltrán J.Q., Gutiérrez R. (2012) Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons. *J Physiol.* 590(19):4789-4800.
- Bergersen L., Ruiz A., Bjaalie J.G., Kullmann D.M., Gundersen V. (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur. J. Neurosci.* 18(4):931-41.
- Berl S., Waelsch H. (1958) Determination of glutamic acid, glutamine, glutathione and gamma-aminobutyric acid and their distribution in brain tissue. *J. Neurochem.* 3(2):161-9.
- Blazquez-Llorca L., García-Marín V., DeFelipe J. (2010) GABAergic complex basket formations in the human neocortex. *J. Comp. Neurol.* 518:4917-4937.
- Bolte S., Cordelières F.P. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* 224:213-232.
- Bonansco C., Fuenzalida M. (2016) Plasticity of hippocampal excitatory-inhibitory balance: Missing the synaptic control in the epileptic brain. *Neural Plast.* 2016: 8607038.
- Boulland J.L., Qureshi T., Seal R.P., Rafiki A., Gundersen V., Bergersen L.H., Fremeau R.T., Edwards R.H., Storm-Mathisen J., Chaudhry F.A. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* 480(3):264-80.
- Boulland J.L., Jenstad M., Boekel A.J., Wouterlood F.G., Edwards R.H., Storm-Mathisen J., Chaudhry F.A. (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb. Cortex.* 19(1):241-248.

Bramham C.R., Torp R., Zhang N., Storm-Mathisen J., Ottersen O.P. (1990) Distribution of glutamate-like immunoreactivity in excitatory hippocampal pathways: a semiquantitative electron microscopic study in rats. *Neuroscience*. 39(2):405-17.

Buzsàki G., Geisler C., Henze D.A., Wang X.J. (2004) Interneuron diversity series: Circuit complexity and axon wiring economy of cortical interneurons. *Trends Neurosci*. 27(4):186-193.

Chaudhry F.A., Reimer R.J., Bellocchio E.E., Danbolt N.C., Osen K.K., Edwards R.H., Storm-Mathisen J. (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J. Neurosci*. 18(23):9733-9750.

Conti F., Rustioni A., Petrusz P., Towle A.C. (1987) Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J. Neurosci*. (6):1887-1901.

Conti F., DeFelipe J., Farinas I., Manzoni T. (1989) Glutamate-positive neurons and axon terminals in cat sensory cortex: a correlative light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol*. 290(1):141-53.

Conti F., Weinberg R.J. (1999) Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 22:451-458.

Conti F., Cherubini E. (2001) Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends in Neurosci*. 24(3):155-162.

Conti F., Candiracci C., Fattorini G. (2005) Heterogeneity of axon terminals expressing VGLUT1 in the cerebral neocortex. *Archives Italiennes de Biologie* 143:127-132.

Crestani F., Lorez M., Baer K., Essrich C., Benke D., Laurent J.P., Belzung C., Fritschy J.M., Lüscher B., Mohler H. (1999) Decreased GABA_A-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat. Neurosci*. 2(9):833-839.

Dehghani N, Peyrache A., Telenczuk B., Le Van Quyen M., Halgren E., Cash S.S., Hatsopoulos N.G., Destexhe A. (2016) Dynamic balance of excitation and inhibition in human and monkey neocortex. *Sci*. 6:23176.

Docherty M., Bradford H.F., Wu J.Y. (1987) Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature* 330:64-66.

Dougherty R.P. (2005) Extensions of DAMAS and benefits and limitations of deconvolution in beamforming. 11th AIAA/CEAS Aeroacoustics Conference (26th AIAA Aeroacoustics Conference), 23-25 May 2005, Monterey, California. AIAA 2005-2961.

Durand G.M., Kovalchuk Y., Konnerth A. (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381(6577):71-75.

Eccles J.C. (1986) Chemical transmission and Dale's principle. *Prog Brain Res.* 68:3-13.

Edwards R.H. (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55:835-858.

Egashira Y., Takase M., Watanabe S., Ishida J., Fukamizu A., Kaneko R., Yanagawa Y., Talamori S. (2016) Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(38):10702-7.

Eichler A.A., Meier J.C. (2008) E-I balance and human diseases - from molecules to networking. *Front. Mol. Neurosci.* 1:2.

El Mestikawy S., Wallén-Mackenzie A., Fortin G.M., Descarries L., Trudeau L.E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* 12(4):204-16.

Erickson J.D., De Gois S., Varoqui H., Schafer M.K., Weihe E. (2006) Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem. Int.* 48(6-7):643-649.

Farsi Z., Preobraschenski J., van den Bogaart G., Riedel D., Jahn R., Woehler A. (2016) Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science.* 351(6276):981-4.

Fattorini G., Verderio C., Melone M., Giovedì S., Benfenati F., Matteoli M., Conti F. (2009) VGLUT1 and VGAT are sorted to the same population of synaptic vesicles in subsets of cortical axon terminals. *J Neurochem.* 110(5):1538-1546.

Fattorini G., Antonucci F., Menna E., Matteoli M., Conti F. (2015) Co-expression of VGLUT1 and VGAT sustains glutamate and GABA co-release and is regulated by activity in cortical neurons. *J. Cell Sci.* 128(9):1669-73.

Ford T.C., Crewther D.P. (2016) A comprehensive review of the ¹H-MRS metabolite spectrum in Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* 9:14.

Freneau R.T., Troyer M.D., Pahner I., Nygaard G.O., Tran C.H., Reimer R.J., Bellocchio E.E., Fortin D., Storm-Mathisen J., Edwards R.H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron.* 31(2):247-260.

Freneau R.T., Burman J., Qureshi T., Tran C.H., Proctor J., Johnson J., Zhang H., Sulzer D., Copenhagen D.R., Storm-Mathisen J., Reimer R.J., Chaudhry F.A., Edwards R.H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(22):14488-93.

Freneau R.T., Voglmaier S., Seal R.P., Edwards R.H. (2004) VGLUTs define subset of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 27(2):98-103.

Freneau R.T., Kam K., Qureshi T., Johnson J., Copenhagen D.R., Storm-Mathisen J., Chaudhry F.A., Nicoll R.A., Edwards R.H. (2004) Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science Reports* 304(5678):1815-9.

García-Marín V., Blázquez-Llorca L., Rodríguez J.R., González-Soriano J., DeFelipe J. (2010) Differential distribution of neurons in the gyral white matter of the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 518:4740-4759.

Gasnier B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327-337.

Gundersen V. (2008) Co-localization of excitatory and inhibitory transmitters in the brain. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 188:29-33.

Gutiérrez R. (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J. Neurophysiol.* 84(6):3088-3090.

Gutiérrez R. (2016) The plastic neurotransmitter phenotype of the hippocampal granule cells and of the moss in their *messy* fibers. *J. Chem. Neuroanat.* 73:9-20.

Hioki H., Fujiyama F., Nakamura K., Wu S.X., Matsuda W., Kaneko T. (2004) Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex.* 14(11):1266-75.

Hnasko T.S., Edwards R.H. (2012) Neurotransmitter corelease: mechanism and physiological role. *Annu Rev Physiol.* 74:225-43.

Hertz L. (2006) Glutamate, a neurotransmitter and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem. Int.* 48:416-425.

Herzog E., Nadrigny F., Silm K., Biesemann C., Helling I., Bersot T., Steffens H., Schwartzmann R., Nägerl U.V., El Mestikawy S., Rhee J.S., Kirchhoff F., Brose N. (2011) *In Vivo* imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1^{Venus} knock-in mice. *J. Neurosci.* 31:15544-15559.

Hicks T.P., Conti F. (1996) Amino acids as the source of considerable excitation in cerebral cortex. *Can J Physiol. Pharmacol.* 74(4):341-361.

Hoftman G.D., Datta D., and David A. Lewis D.A. (2016) Layer 3 excitatory and inhibitory circuitry in the prefrontal cortex: developmental trajectories and alterations in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* pii: S0006-3223(16)32427-1.

Hökfelt T., Johansson O., Goldstein M. (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225(4668):1326-34.

Kaneko T., Fujiyama F. (2002) Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res.* 42(4):243-250.

Kao Y.H., Lassová L., Bar-Yehuda T., Edwards R.H., Sterling P., Vardi N. (2004) Evidence that certain retinal bipolar cells use both glutamate and GABA. *J Comp Neurol.* 478(3):207-18.

Jonas P., Bischofberger J., Sandkühler J. (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science.* 281(5375):419-424.

Johnson J.L. (1972) Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. A review. *Brain Res.* 37(1):1-19.

Lebrand C., Cases O., Adelbrecht C., Doye A., Alvarez C., El Mestikawy S., Seif I., Gaspar P. (1996) Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron.* 17(5):823-35.

Lee E., Lee J., Kim E. (2016) Excitation/Inhibition imbalance in animal models of Autism Spectrum Disorders. *Biol. Psychiatry.* pii: S0006-3223(16)32387-3.

Liu G. (2004) Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat. Neurosci.* 7:373-379.

Martens H., Weston M.C., Boulland J.L., Grønborg M., Grosche J., Kacza J., Hoffmann A., Matteoli M., Takamori S., Harkany T., Chaudhry F.A., Rosenmund C., Erck C., Jahn R., Härtig W. (2008) Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses. *J Neurosci.* 28(49):13125-31.

McIntire S., Reimer R.J., Schuske K., Edwards R.H., Jorgensen E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.

Melone M., Burette A., Weinberg R.J. (2005) Light microscopic identification and immunocytochemical characterization of glutamatergic synapses in brain sections. *J. Comp. Neurol.* 492:495-509.

Münster-Wandowski A., Gómez-Lira G., Gutiérrez R. (2013) Mixed neurotransmission in the hippocampal mossy fibers. *Front. Cell Neurosci.* 7:210.

Münster-Wandowski A., Zander J.F., Richter K., Ahnert-Hilger G. (2016) Co-existence of Functionally Different Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Front Synaptic Neurosci.* 8:4.

Nagai T., Ibata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K., Miyawaki A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20:87-90.

Nishimaru H., Restrepo C., Ryge J., Yanagawa Y., Kiehn O. (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(14):5245-5249.

Ottem E.N., Godwin J.G., Krishnan S., Petersen S.L. (2004) Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *J. Neurosci.* 24(37):8097-8105.

Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp. Neurol.* 229(3):374-92.

Padamsey Z., Jeans A. (2012) Imaging synaptic vesicles using VGLUT1-venus knock-in mice: insights into the dynamic nature of intersynaptic vesicle exchange. *J Neurosci.* 32(10):3284-3286.

Paxinos G., Watson C. (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press.

Paxinos G., Franklin K.B.J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press.

Perea G., Navarrete M., Araque A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8):421-31.

Peters A., Palay S.L. (1996) The morphology of synapses. *J. Neurocytol.* 25(12):687-700.

Roberts E, Kuriyama K. (1968) Biochemical-physiological correlations in studies of the gamma-aminobutyric acid system. *Brain Res.* 8(1):1-35.

Roberts P.J., Storm-Mathisen J., Johnston G.A.R. (1981) *Glutamate: transmitter in the central nervous system.* Chichester: John Wiley & Sons.

Safiulina V.F., Fattorini G., Conti F., Cherubini E. (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. *J. Neurosci.* 26(2):597-608.

Sagnè C., El Mestikawi S., Isambert M.F., Hamon M., Henry J.P., Giros B., Gasnier B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome database. *FEBS Lett.* 417:177-183.

Sandler R., Smith A.D. (1991) Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 303(2):177-92.

Seal R.P., Edwards R.H. (2006) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr. Opin. Pharmacol.* (1):114-9.

Shu Y., Hasenstaub A., McCormick D.A. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423: 288-293.

Silinsky E.M. (1975) On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol.* 247(1):145-62.

Sloviter R.S., Dichter M.A., Rachinsky T.L., Dean E., Goodman J.H., Sollas A.L., Martin D.L. (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 373(4):593-618.

Somogyi J., Baude A., Omori Y., Shimizu H., El Mestikawy S., Fukaya M., Shigemoto R., Watanabe M., Somogyi P. (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 19(3):552-69.

Storm-Mathisen J., Leknes A.K., Bore A.T., Vaaland J.L., Edminson P., Haug F.M., Ottersen O.P. (1983) First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* 301(5900):517-20.

Sulzer D., Joyce M.P., Lin L., Geldwert D., Haber S.N., Hattori T., Rayport S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J. Neurosci.* 18(12):4588-602.

Takamori S., Riedel D., Jahn R. (2000) Immunolocalization of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 20(13):4904-4911.

Takamori S., Rhee J.S., Rosenmund C., Jahn R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J. Neurosci.* 21(22):RC182.

Takamori S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci. Res.* 55:343-351.

Tritsch N.X., Granger A.J., Sabatini B.L. (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci.* 17(3):139-45.

Varoqui H., Schäfer M.K., Zhu H., Weihe E., Erickson J.D. (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 22(1):142-55.

Valente P., Orlando M., Raimondi A., Benfenati F., Baldelli P. (2016) Fine tuning of synaptic plasticity and filtering by GABA released from hippocampal autaptic granule cells. *Cerebral Cortex* 26:1149-1167.

Walker M.C., Ruiz A., Kullmann D.M. (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses. *Neuron* 29(3):703-15.

Weisskopf M.G., Zalutsky R.A., Nicoll R.A. (1993) The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. *Nature.* 365(6442):188.

Whittaker V.P., Dowdall M.J., Boyne A.F. (1972) The storage and release of acetylcholine by cholinergic nerve terminals: recent results with non-mammalian preparations. *Biochem. Soc. Symp.* (36):49-68.

Zander J.F., Münster-Wandowski A., Brunk I., Pahner I., Gómez-Lira G., Heinemann U., Gutiérrez R., Laube G., Ahnert-Hilger G. (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 30(22):7634-45.

Zheng H.E., Wang W.Q., Li X.M., Rauw G., Baker G.B. (2016) Body fluid levels of neuroactive amino acids in Autism Spectrum Disorders: a review of literature. *Amino Acids*. DOI: 10.1007/s00726-016-2332-y.

Zhou F.M., Liang Y., Salas R., Zhang L., De Biasi M., Dani J.A. (2005) Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron*. 46(1):65-74.

Zimmermann J., Herman M.A., Rosenmund C. (2015) Co-release of glutamate and GABA from single vesicles in GABAergic neurons exogenously expressing VGLUT3. *Front. Synaptic Neurosci.* 7:16.